

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] a) It consists of a poly anion and a poly cation a transparence base material and alternately with b. A biotin-ized poly cation is contained as the maximum upper layer, and whenever [biotin-ized] is based on the number of equivalence of a cationic radical. And 20-80-mol %, Suitably A 30-70-mol % and adjoining multiplex [which are 40-60-mol % especially suitably] layer, c) Covering by the streptoavidin combined with this biotin-ized layer of the biotin-ized cationic maximum upper layer, d) Are combinable with the analyte by which the indicator was carried out by fluorescent dye F2. Fluorescent dye F1 in the Pori ionicity base material layer [which can be combined with streptoavidin, or the living thing molecules which have combined the further antibody or those antibodies] It is the optical solid phase biosensor which has a living thing molecule as an acceptor for recognizing analyte specifically using the further biotin metaplasia object molecule as an acceptor, and the Foerster energy transfer between two sorts of fluorescent dye F1 and F2 which comes to contain an antibody suitably.

[Translation done.]

Best Available Copy

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] The indicator of this invention can be carried out by fluorescent dye, and it relates to the optical biosensor for detecting the dissolved molecule (it being hereafter called analyte) a living thing molecule (it is hereafter called an acceptor) recognizes the existence to be specifically. In this case, what related is a solid phase sensor with fluorescent dye whose measurement of existence of that molecule and an amount is attained according to the energy transfer process to the molecule by which the indicator was carried out by the second fluorescent dye, and which should be detected. According to a permutation or the sandwiches reaction, measurement of non-indicator analyte also becomes possible.

[0002]

[Background of the Invention] There are various approaches in detecting analytes, such as the hormone in the liquid sample of the biological origin, an enzyme, other protein, a carbohydrate, a nucleic acid, a pharmacology-activity compound, and a toxin. In a known approach, immunoassay and the approach relevant to it are prominent as a high sensitivity detecting method for measuring the pole small quantity of an organic substance. Generally, immunoassay is based on the capacity combined very specifically by the approach of starting at this molecule, even if an acceptor molecule, for example, an antibody, recognizes the structure and the molecule-configuration of a ligand molecule specifically and it is prescribed to be based on a non-polarity and/or a polar mutual reaction.

[0003] Immunoassay is performed using various approaches. Various indicator techniques are included in these approaches, and they aim at carrying out the quantum of the analyte by the approach of radioactivity, enzyme association, and fluorescent labeling in many cases (E. F.Ulman, P.L.Khanna, Methods in Enzymology, 74 (1981) 28-60). The fluorescence energy transfer (the Foerster energy transfer or resonance energy migration, RET) without a radiation is considered to be the special case of the approach indicated at the end, uses this, and even when a mutual distance is several [at most] nm, it can measure the relative geometric location of two sorts of fluorescent dye. Therefore, the instant interaction of an acceptor / ligand pair is directly detectable (L. Stryer, Annual Reviews in Biochemistry 47 (1978) 819-846). This principle is repeatedly described in the technique of immunoassay and a biosensor system (S. the M.Barnard, D.R.Walt, and Science patent [251,927 (1991) and Europe] No. 150905 description, the West German patent No. 3938598 description).

[0004] Furthermore, this invention relates to immobilization of the living thing molecule to the inside of the layer system which was thinly ready in molecule suitable for especially the optical biosensor that uses the Foerster energy transfer as a detection principle. Immobilization of the acceptor on solid phase is deterministically [for a biosensor] important. According to the current technique, it combines with a front face in adsorption by ionicity or the hydrophobic interaction, or protein is usually combined by covalent bond using an adjuvant. As a model example of the approach of the above-mentioned latter, glass is activated by 3-aminopropyl triethoxysilane, protein is succeedingly combined by glutaraldehyde, and the approach of returning the obtained Schiff base by the hydrogenation sodium borate is mentioned. The total

theory of the approach used by immunoassay is in for example, P.T. Jensen work "the actual condition of enzyme immunoassay and the theory (Practice and Theory of Enzyme Immunoassays)", and the 297 - 328th page (Elsevier, Amsterdam 1987). Furthermore, as the bionics-approach, the approach of enclosing an enzyme into a penetrable polymer or the film is usually.

[0005]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] Although there is a fault that the stability of protein immobilization runs short, by the approach performed by adsorption, when there are many process steps and a high grade comparatively, the activity of an unstable reagent or the activity of the reaction condition no protein is necessarily stable is needed by the covalent bond using a binder or an activator in many cases. Since an acceptor does not combine with a site specific, the most usual immobilization technology has the common trouble that the body important for the next reaction is intercepted in three dimensions, in the acceptor of high percent. Since coating of the front face by the protein for proteinic denaturation is too much thin, the effectiveness of protein immobilization runs short in many cases. Furthermore, since some activators may construct a bridge, they deteriorate the sharpness of the front face obtained. Therefore, immobilization is very deficient in repeatability. In the case of the quantum of the analyte concentration by the Foerster energy transfer, it has become clear that that change with the presentations on the front face of local irregularly, and this is generally accompanied by lowering of the measuring accuracy of this system relation has an inconvenient distance between an energy donator and an acceptor.

[0006] One possibility which solves the trouble of the above-mentioned system relation is coating a base material with the film which was ready in molecule. Like a publication for example, on the West German patent No. 4319037 descriptions, this is the thin film plasticity copolymer containing the comonomer which has a reactant radical in a side chain to which covalent bond of the protein which should be fixed besides a structure formation unit can be carried out, and can be performed by coating a base material. The fault of this approach is that the number of reactant radicals is generally restricted by restricting the ratio of the reactant monomer in a polymer. As a result, the thickness of coating of the acceptor on a front face becomes too much thin in many cases.

[0007] The further fault in the concept of a biosensor is a nonspecific interaction which often happens between protein and a solid phase front face. By this, adsorption by the hydrophobicity which is not desirable, or the ionicity interaction takes place, and the result which does not have repeatability arises, and it becomes reduction in the accuracy of measurement.

[0008]

[Means for Solving the Problem] This invention consists of a poly anion and a poly cation a transparence base material and alternately with b. A biotin-ized poly cation is contained as the maximum upper layer, and whenever [biotin-ized] is based on the number of equivalence of a cationic radical. And 20-80-mol %, Suitably A 30-70-mol % and adjoining multiplex [which are 40-60-mol % especially suitably] layer, c) Covering by the streptoavidin combined with this biotin-ized layer of the biotin-ized cationic maximum upper layer, d) Are combinable with the analyte by which the indicator was carried out by fluorescent dye F2. Fluorescent dye F1 in the Pori ionicity base material layer [which can be combined with streptoavidin, or the living thing molecule or antibody which has combined the further antibody] It is related with the optical solid phase biosensor which has a living thing molecule as an acceptor for recognizing analyte specifically using the further biotin metaplasia object molecule as an acceptor, and the Foerster energy transfer between two sorts of fluorescent dye F1 and F2 which comes to contain an antibody suitably.

[0009] In a suitable mode, in a layer given in c, a biotin-ized acceptor can join together and it can fix an antibody by the specific recognition reaction at this acceptor part.

[0010] Therefore, this invention is the thing of a property permanent [the immobilization] and direct about immobilization of a up to [the solid phase of living thing molecule especially acceptor, or antibody **], and coating thickness with a large front face with an acceptor is attained. Association of analyte is detected by the Foerster energy transfer, and is reproducible

for the mutual array of a energy donator and an acceptor which was ready in molecule, and regular in the concentration dependency. A front face is simultaneously inactivated to proteinic nonspecific adsorption. In this invention, organic and by using natural biotin / streptoavidin system, and fixing a biological component in the layer which was ready in molecule, these requirements are investigated and the above-mentioned technical problem is solved. Streptoavidin is protein which has four binding sites to a biotin (BITAMMINH). So, it can be used as a matrix for association of a biotin metaplasia object molecule. Since the biotin coupling constant to streptoavidin is -10^{15}M^{-1} , it is almost irreversible in biotin association to streptoavidin.

[0011] It is characterized by especially this invention using the poly cation and the poly anion for construction of a multiplex layer.

[0012] this invention — general — a float glass — or — quartz glass — or — for example, — polyester — a polycarbonate — or — polyethylene terephthalate — like — organic — a polymer — or — others — transparence — un— fluorescence — a solid-state — anionic — cationicity — a polymer — continuous — physical adsorption — depending — self — collection — (— SA —) — a technique — multiplex — a layer — coating — things — realizing . This approach is indicated by the Europe patent No. 472990 description at the detail. In this invention, the layer of the last of the multiplex layer by which physical adsorption is carried out is the poly cation biotin-ized on the amino group. the poly cation — an approach given in the Europe patent No. 0472990 description — following — biotin-N-hydroxysuccinimide ester or other reactant ester — using — the number of equivalence of a cationic radical — receiving — 20–80–mol % — suitable — 30–70–mol % — it is especially biotin-ized to 40–60–mol % suitably. The poly cation suitable for this invention is the copolymer of for example, the poly lysine, the poly allylamine, a polyvinyl amine, Polly (4-vinylpyridine), polyacrylamide, poly methacrylamide, Pori Arginine, the poly asparagine, the poly glutamine, polyethyleneimine, and those fundamental monomers, and are the poly lysine and the poly allylamine suitably. For example, these poly cations in which a nitrogen atom exists as ammonium which has 2 or three hydrogen atoms can have an aliphatic-carboxylic-acid anion like a chloride or a halogenide like a bromide, a sulfate, a bisulfate, a nitrate, a nitrite, a carbonate, a bicarbonate, phosphate, hydrogen phosphate and formate, acetate, a trifluoroacetic acid salt, or a trichloroacetic-acid salt as a counter ion. The biotin-ized possible poly cation according to this invention is the copolymer of the poly lysine, Pori Arginine, the poly glutamine, the poly asparagine, polyacrylamide, poly methacrylamide, the poly allylamines, and those fundamental monomers, and are the poly lysine and the poly allylamine suitably. The poly allylamine is the copolymer of for example, polystyrene sulfonate (PSS), polyacrylic acid, polymethacrylic acid, Polly (2 - acrylic-amino-2-methyl-1-propane sulfonic acid), a polyvinyl sulfonic acid, polyvinyl sulfate, dextran sulfate, cellulose sulfate, and those fundamental monomers, and is polystyrene sulfonate suitably. The pair cations in the poly anion are H^+ , Na^+ , K^+ , and NH_4^+ , and are Na^+ or K^+ suitably. The equivalent of a biotin-ized cation can be adjusted by the stoichiometry of the desired amount required. Streptoavidin is combined with a biotin-ized polymer layer as a result of an incubation with streptoavidin. Next, as a fluorescence experiment shows, coating of the front face is carried out without interruption almost thoroughly by streptoavidin. This system shows the requirements and advantage which were demanded above about the biosensor. Nonspecific interaction is intercepted by coating by the thickest possible protein streptoavidin, and, on the other hand, a biosensor front face makes an omnipotent joint matrix available by it for functionalization of the solid-state interface used as a biosensor. A donator color can be used now for this contractor for the Foerster energy transfer for labeling of the protein streptoavidin by fluorescent dye F1 (for example, fluorescence isothiocyanate) which is common knowledge enough.

[0013] After fixing streptoavidin on a biotin-ized polymer front face, the streptoavidin with the bonding site by which coating is not carried out yet serves as a matrix for especially an antibody to join together, in order that the further biotin metaplasia object molecule may join together as an acceptor. Two or more suitable strange methods for association of an antibody are possible. Therefore, one mode of this invention is the approach of combining the biotin-ized protein A or biotin-ized protein G with a streptoavidin matrix. protein A — N-hydroxysuccinimide — or pass

other reactant ester — biotin-izing is easily known well possible by this contractor. Protein A is a protein obtained from the cell wall of bacteria staphylococcus AUREUS. The immunoglobulin of an IgG mold is specifically combinable on those Fc parts. This approach has the advantage which fixes an antibody in a site specific further. The Fab part of an antibody is isolation. Reduction of immunological activity takes place for cutoff of an antigen binding site. Besides association to the streptoavidin of F1, F1 is combinable with other above-mentioned living thing molecules again. However, association to streptoavidin is suitable.

[0014] This kind of optical solid phase biosensor can be used with the gestalt of for example, a trial strip.

[0015] Other modes of an immuno sensor come to contain association of the biotin-ized antibody to a streptoavidin matrix. Two modes by this invention can be considered in this context. one side — an antibody — biotin-N-hydroxysuccinimide — or pass other reactant ester — it can be biotin-ized. The gestalt which biotin-ization of an antibody requires is well known to this contractor, and it has the fault that biotin-ization does not take place to a site specific. Some IgG molecules are biotin-ized in an antigen binding site or the neighborhood of it, and, as a result, the latter solid cutoff takes place, and the immunological activity of an antibody and the sensibility of a sensor decrease. In other modes by this invention, the antibody which oxidized, and the biotin derivative which has the hydrazide reactivity radical which reacts are used. During oxidation of an antibody, the carbohydrate located on Fc part of IgG cleaves to this contractor at the reaction (glycol cleavage) which is known, and generates an aldehyde. These react with the hydrazide radical of a biotin derivative, and generate a hydrazone. A biotin radical is combined with Fc part of an antibody at a site specific. A biotin-ized antibody is combined with a streptoavidin matrix, the front face of the trial strip of an immuno sensor is completed, and association which passes through biotin-ized protein A is not needed.

[0016] next, the analyte equipped with the acceptor color F2 (for example, rhodamine isothiocyanate) with a suitable trial strip — as the result of the interaction of an acceptor especially an antibody, and analyte — recognition — and a quantum can be carried out. Analyte contacts simply the base material by which coating was carried out in the solution (sample solution) with which it is suspected that the molecule as analyte exists, and is detected by performing fluorometry continuously. The fluorescence of a donator color (F1) and an acceptor color (F2) is measured. When the analyte by which the indicator was carried out with the acceptor color F2 is in a test fluid object (sample solution), after combining with a fixed antibody specifically, as compared with an uncombined condition, the reinforcement of acceptor fluorescence increases as a result of the Foerster energy transfer, and the reinforcement of a donator decreases. As an exception method, when non-indicator analyte must be measured by the substitution reaction, a trial strip is first equilibrated with the acceptor indicator analog of related analyte. The acceptor fluorescence of F2 excels the donator fluorescence of F1 in this condition. When the non-indicator analyte from a test fluid object contacts the equilibrated trial strip, the Foerster energy transfer is interrupted after a substitution reaction, and, as a result, association of non-indicator analyte is shown by reduction of the increment in the donator fluorescence of F1, and the acceptor fluorescence of F2. In both cases, change of acceptor fluorescence and donator fluorescence is clearly connected with the concentration of analyte. Although the Foerster energy transfer can be measured with the fluorescence spectrometer of common use, it can also measure with the equipment designed specially because of the immuno sensor of energy transfer. Subsequently, a suitable measuring curve can determine the concentration of the analyte in an analysis liquid. In the further mode, it is added with a known amount in the analysis liquid which can consider the existence of the analyte which the molecule by which the indicator was carried out by fluorescent dye F2, and which is combined specifically should detect which competes with this about association to the maximum upper layer of a sensor under existence of the analyte which should be detected. Subsequently, the concentration of the analyte which should be detected is measured by the dependency of the ratio of the fluorescence intensity of F1 or F2, or two reinforcement.

[0017] As for other modes by this invention of an immuno sensor, the donator color F1 comes to contain joining together by the acceptor and the hydrazide reactivity radical of the antibody to

which the above-mentioned gestalt oxidized suitably to the antibody. In this mode, it can be used for the effectiveness of the Foerster energy transfer increasing only reduction of the mean distance between a donator color (F1) and an acceptor color (F2), and this making the sensibility of a test method increase.

[0018] The following drawing explains this invention to a detail.

[0019] drawing 1 — the structure (above figure) and the detection principle (the following figure) of a multiplex layer of a trial strip for the immuno sensor of the Foerster energy transfer — a graph — most scales show-like.

[0020] Drawing 1 : the diagrammatic structure of an immuno sensor — a function. The molecule-component is drawn with most scales. A base material I is thicker than a publication.

[0021] The antibody V fixed the streptoavidin layer III by which fluorescent labeling was carried out in the above figure in :transparence base material I (for example, glass) and the multiplex layers II (only the last biotin-ized layer is shown in order to simplify drawing), and F1 of a polyelectrolyte, biotin-ized protein A horizon IV, and on it.

[0022] the following figure — : — it depends for the wavelength of the fluorescence observed after making it become wet with test fluid on whether for the excitation energy after carrying out energy transfer (arrow head of an RET= broken line) to whether direct luminescence exists after the fluorescent dye F1 combined with streptoavidin excites, and indicator analyte (arrow head of a dotted line) to carry out a red shift, and to emit light (arrow head of a continuous line). It depends for the ratio of the red shift to the reinforcement of direct luminescence on the number of the joint analyte molecules per area clearly.

[0023] Drawing 2 shows the X-ray reflective curve of the layer structure in each phase of manufacture.

[0024] Drawing 2 : the X-ray reflective curve of the layer structure (base-material matter: silicon) in each phase of manufacture is shown. As compared with each **** and mutual, 100 carried out the factor deviation of each set of data. In upper order, a curve first shows the multiplex layer of a polyelectrolyte, the layer by which coating was subsequently carried out by streptoavidin, the layer by which coating was succeedingly carried out further by biotin-ized protein A, and the layer which equipped the last with the IgG antibody from the bottom. The pulse migration Qz is plotted by the axis of abscissa by A-1, and X-ray intensity I is plotted by the axis of ordinate.

[0025] From the measurement result in the case of this example, coating of the front face is carried out by the volume phase of an organic substance which grew regularly in each manufacture phase, and it turns out from it at each process that a sample is smooth in molecule. It means that this does not become especially coating of a solid phase interface by which the result of surface functionalization has heterogeneous structure sideways, namely, drop formation does not take place in the linear scale of NANOMETA.

[0026] Drawing 3 was manufactured by drawing 1 like the approach of a publication, and shows the ELISA measurement result on the sensor front face recorded by measurement of X-ray reflexivity into drawing 2.

[0027] Drawing 3 : the titration by the antigen on the various front faces of a sensor. The specific binding was detected by ELISA. IgG compared the sample (white diamond mark) which adsorbed in static electricity on the PSS layer with the sensor (black diamond mark) manufactured by the technique indicated on these descriptions. The antigen concentration cAG (a mol/l) has optical density A ($\lambda=414\text{nm}$) in an axis of abscissa for an axis of ordinate.

[0028] Drawing 4 shows the result of the biosensor measurement on a sample given in drawing 3, and the sample manufactured similarly.

[0029] Drawing 4 : the titration (black diamond mark) by the antigen on the front face of a sensor. Specific association was detected by energy transfer. The antigen existed in the culture supernatant liquor of twice [about] dilution. Contrast (white diamond mark): Adsorption of the antigen on the trial strip created only to the streptoavidin layer (with protein A and no acceptor layer). An axis of abscissa shows the concentration cAG (a mol/l) in culture supernatant liquor. An axis of ordinate shows 577 of fluorescent dye F1 and F2, and the ratio of 530nm fluorescence intensity.

[0030]

[Example]

1. The used chemistry article polymer : polystyrene sulfonate, sodium salt (PSS), MW=70,000, and Aldrich

[0031] The poly allylamine hydrochloride (PAH), MW=50,000–60,000, and Aldrich

[0032] Polyethyleneimine (PEI), a MW=50,000 or 50% concentration water solution, and Aldrich

[0033] Poly-L-lysine bromate (salt PL) MW<50,000 and Bachem-Biochemica

[0034] PSS was dialyzed [as a water solution] to very pure water for two days in VISKING27 / 32 dialysis tubes of Roth, and, subsequently was freeze-dried.

[0035] Protein: Streptoavidin and Boehringer-Mannheim

[0036] Protein A and Pharmacia

[0037] Rabbit IgG, poly clo NARU, singularity: The anti-mouse IgG, Immunol.Institute Univ.Mainz.

[0038] Bovine serum albumin (BSA) and Sigma

[0039] Antibody: Mouse IgG, a monoclonal, culture supernatant liquor, Immunol.Institute Univ.Mainz.

[0040] The horseradish peroxidase (HPO) joint mouse IgG, affinity purification, Jackson Immuno-Research Laboratories, Dianova, U.S.A.

[0041] Fluorescent substance: Rhodamine B isothiocyanate (RITC) and Sigma

[0042] The fluorescein isothiocyanate isomer I (FITC) and Sigma

[0043] Labeling of streptoavidin was performed by an average of 1.4 FITC per protein molecule, and labeling of Mouse IgG was performed by an average of 3 RITC(s) per protein molecule.

[0044] Biotin activity ester: Biotin amide caproyl-N-hydroxysuccinimide ester and Sigma

[0045] In order to biotin-ize protein A, weighing capacity of activity ester and the protein was carried out by the molecular proportion of 12 to 1.

[0046] Cleaning agent: Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (TWEEN20) and Sigma

[0047] PBS buffer: Dibasic sodium phosphate, monohydrate, p.a., and Merck

[0048] Disodium hydrogenphosphate, p.a., and Merck

[0049] A sodium chloride, p.a., and Merck

[0050] Citric-acid buffer: Disodium hydrogenphosphate, p.a., and Merck

[0051] Citric-acid monohydrate and Sigma

[0052] Potassium chloride, p.a., and Merck

[0053] A magnesium chloride, six hydrates, p.a., and Merck

[0054] ABTS: A 2 and 2'-AJINO-screw (3-ethyl-benzothiazoline)-sulfonic acid and Sigma

[0055] Glass substrate: (38x12) mm² and (1-1.2) the microscope slide of mm thickness, Gebr.Rettberg GmbH

[0056] 2. According to the standard procedure (W. 31 (1970) Kern, D.A.Puotinen, RCA Review, 187), clarification of the clarification base material of a base material was carried out.

[0057] 3. The solution of all manufactures of a base material was manufactured using distilled water. The base material which carried out humidity with water was put in for 30 minutes into the PEI solution (it diluted [ml] in 2.2mg /), and, subsequently 10ml water washed for about 30 seconds 3 times each time, and it is among the flow which nitrogen subsequently carried out slowly, and was air-dry. Subsequently, the sample was paid for about 20 minutes into the PSS solution (20mg PSS in a 10ml 2M NaCl solution), and was washed, and it dried as above-mentioned. The base material was put in for 20 more minutes into the PAH solution (20mg PAH in a 10ml 2M NaCl solution), and was washed again, and it dried. The further PSS layer, a PAH layer, and PSS were made to adsorb on a base material in order like the above. In order to functionalize by the biotin, the base material was put in for 20 minutes into the solution of the biotin-ized poly lysine bromate salt (PLB) (5mg / 10ml in 0.4M NaCl), and subsequently it washed, and dried again. The coating base material was stored at the temperature of 4 degrees C until it used it.

[0058] 4. Creation-LB Coating Base Material of Protein Different-Species Multiplex Layer — Inside of FITC-Streptoavidin Solution (10MMPBS Buffer Solution —) pH=7, the ten - seven mols [/ l.] FITC-streptoavidin in .2, 150mM(s) It put into NaCl for about 30 minutes, and 10ml water washed 3 times, subsequently to the inside of the solution (5xten - seven mols [l.] /, above-

mentioned PBS buffer solution) of biotin-ized protein A, it put in for 40 more minutes, and the pure PBS buffer solution washed 3 times. The desiccation process between each protein coatings was skipped. The base material by which coating was carried out by protein A was put in for 40 minutes into the rabbit IgG solution (singularity: the anti-mouse IgG, 5xten - seven mols [l.] / , the above-mentioned PBS buffer solution), and the pure buffer solution washed 3 times. To association of an antigen, the base material was stored in the PBS buffer solution.

[0059] Drawing 2 shows the X-ray reflective curve measured between each adsorption process under manufacture of a trial strip (base material matter silicon) (dried sample). It is checked that the increment in that a uniform coherent layer system is formed with a linear-molecule-graduation between adsorption processes and the bed depth of each **** is in agreement with the molecule-dimension of an absorbent from these results and that the front face after each adsorption process is smooth in molecule. An exception is an end antibody layer and it contains the buffer water solution of a large quantity for part alternative association by the long molecular shape and the protein A of an antibody. It seems that this layer collapses at the desiccation process under measurement, and it becomes thin notably rather than it is expected from a molecule-dimension after that. The experimental data from drawing 2 is quantitatively estimated by the table 1.

[0060]

Table 1 Molecule-dimension of activity volume phase of immuno sensor Coating process
Increment in a bed depth Surface roughness (A) An organic interface / air (A)

Polyelectrolyte layer of six molecules 203 6 (PLB is included)

Polyelectrolyte film / PLB 56 On the streptoavidin layer streptoavidin layer on 11 7 On 11
biotin-ized protein protein A 13 17 rabbit IgG (anti-mouse)

5. The incubation with an antigen and the a.ELISA test portion including contrast were manufactured on silicon as above-mentioned. 10mg [/ml] BSA was dissolved into the PBS buffer solution which contains TWEEN20 0.1%. This protein solution was used for the ELISA measurement for manufacture of the dilution sequence (concentration is 10-13 to ten - 17 mols/l.) of a HPO labelled antibody (mouse IgG-HPO). After incubating with an antigen, the sample was developed and measured in the citrate buffer solution which has ABT of 3 g/l, and H [0.0075% of]22O. The typical result about the sample manufactured by the technique of a publication is shown in this description at drawing 3 . Titration of the sample to which only IgG was made to stick in static electricity is compared with this on the silicon interface by which coating was carried out by PSS of a thin molecular layer. The high sensibility used as the description of the sample manufactured by the new technique, good linearity, and low nonspecific adsorption can see clearly all over drawing.

[0061] b. The fluorometry sample was manufactured on the float glass as above-mentioned. 10mg [/ml] BSA was dissolved into PBS. This protein solution was used for manufacturing the dilution sequence of a RITC labelled antigen. By this dilution sequence, the concentration of an antigen was 2.5×10^{-9} to 5xten - six mols/l. The base material was put in for about 40 minutes into the solution of a certain fixed concentration, and it washed 5 times for about 1 minute in the PBS buffer solution (the above-mentioned buffer presentation) subsequently processed by TWEEN20 0.1%. It is among the flow of nitrogen, the base material was air-dried, and it stored at 4 degrees C to measurement in the dark place.

[0062] in order to carry out the quantum of the nonspecific mutual reaction of an antigen and a substrate, the base material was coated with the same sequence to the streptoavidin layer (however, protein A and an IgG layer — nothing), and it put in for about 40 minutes into the antigen content solution of a dilution sequence at each ****, and it washed as above-mentioned and dried.

[0063] In order to measure fluorescence energy transfer by the fluorescence spectrometer and dryness of common use of a sample and a criteria base material, it measured with the equipment designed specially. Drawing 4 shows a typical result.

[0064] In addition, the main description and main mode of this invention are indicated below.

[0065] 1.a) It consists of a poly anion and a poly cation a transparence base material and alternately with b. A biotin-ized poly cation is contained as the maximum upper layer, and

whenever [biotin-ized] based on the number of equivalence of cationic radical. And 20-80-mol %, Suitably A 30-70-mol % and adjoining multiplex [which are 40-60-mol % especially suitably] layer, c) Covering by the streptoavidin combined with this biotin-ized layer of the biotin-ized cationic maximum upper layer, d) Are combinable with the analyte by which the indicator was carried out by fluorescent dye F2. Fluorescent dye F1 in the Pori ionicity base material layer [which can be combined with streptoavidin, or the living thing molecule or antibody which has combined the further antibody] It is the optical solid phase biosensor which has a living thing molecule as an acceptor for recognizing analyte specifically using the further biotin metaplasia object molecule as an acceptor, and the Foerster energy transfer between two sorts of fluorescent dye F1 and F2 which comes to contain an antibody suitably.

[0066] 2. Optical biosensor given in the above 1 which donator color F1 has combined with streptoavidin.

[0067] 3. It is an optical biosensor given in the above 1 combined with the streptoavidin layer especially through protein A or Protein G with the acceptor and the biotin metaplasia object molecule whose antibody is not an antibody in itself suitably.

[0068] 4. They are the acceptor biotin-ized and an optical biosensor given in the above 1 which the antibody has combined with the streptoavidin layer suitably.

[0069] 5. Optical biosensor given in the above 1 by which concentration of analyte molecule combined eventually is instead measured [in other molecules whose analyte molecules are not analyte, and with which it was combined with the maximum upper layer, and the indicator was carried out by fluorescent dye F2] as function of change of increment in reduction of fluorescence intensity of F2, or fluorescence intensity of F1, or ratio of two reinforcement from the maximum upper layer.

[0070] 6. Optical biosensor given in the above 1 which competes with molecule which is added in analysis solution with known amount, by which indicator was carried out by fluorescent dye F2, and which is combined specifically in order for analyte molecule to make it combine with the maximum upper layer of biosensor which is not analyte, and is measured as function of ratio of reinforcement whose concentration of analyte is fluorescence intensity of F2 or F1, or two.

[0071] 7. Optical biosensor given in the above 1 whose used quality of support is float glass, quartz glass, polyester, polyethylene terephthalate, polycarbonate, or other transparent non-fluorescence solid-states.

[Translation done.]

* NOTICES *

JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.*** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the structure and the function of an immuno sensor in graph.

[Drawing 2] It is drawing showing the X-ray reflective curve of the layer structure in each phase of manufacture.

[Drawing 3] It is drawing having shown adsorption of the antigen on a sensor front face by ELISA measurement about the sample (white diamond mark) which made IgG adsorb in static electricity on the sample (black diamond mark) manufactured by the approach given in this description, and an PSS layer.

[Drawing 4] It is drawing having shown adsorption of the antigen on a sensor front face by fluorometry about the sample (white diamond mark) which coated this description with the sample (black diamond mark) and base material which were manufactured by the approach of a publication in the same sequence to the streptoavidin layer.

[Description of Notations]

- 1 Transparence Base Material
- 2 Polyelectrolyte Multiplex Layer (Only Biotin-ized Layer is Indicated)
- 3 Streptoavidin Layer by Which Fluorescent Labeling was Carried Out by F1
- 4 Biotin-ized Protein A Horizon
- 5 Fixed Antibody

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

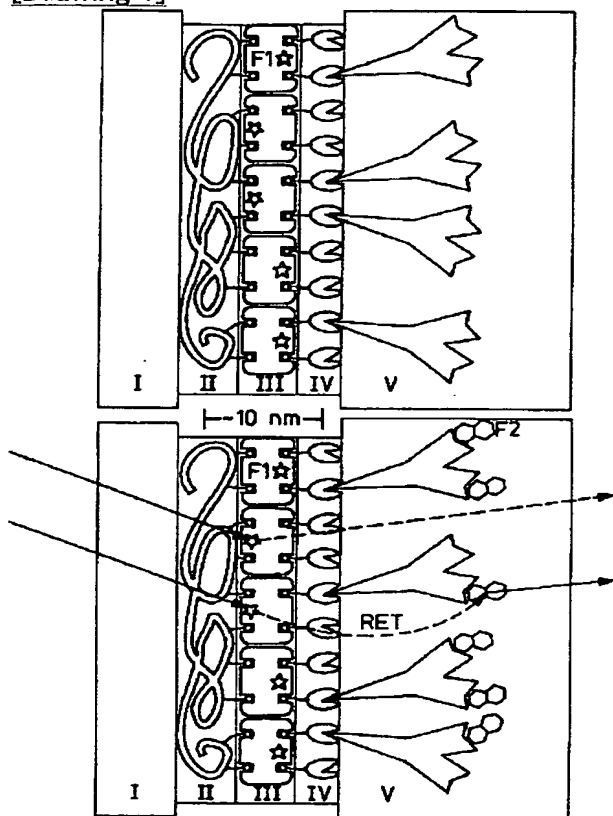
1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.**** shows the word which can not be translated.

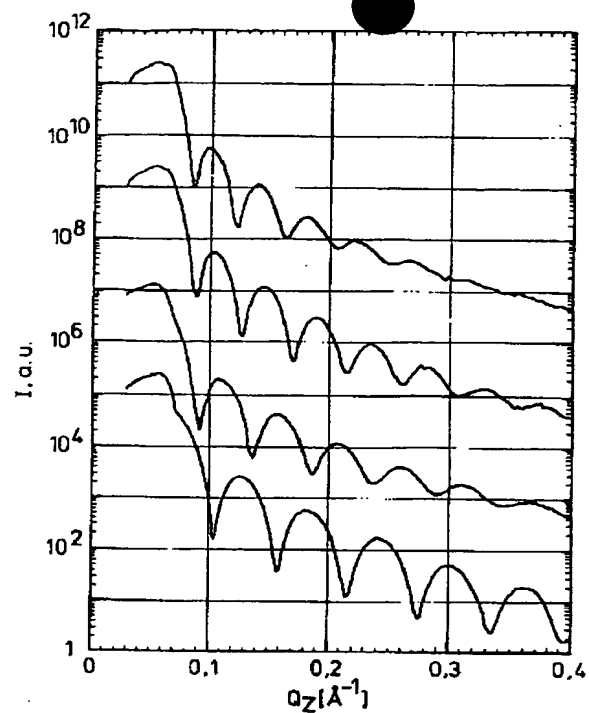
3.In the drawings, any words are not translated.

DRAWINGS

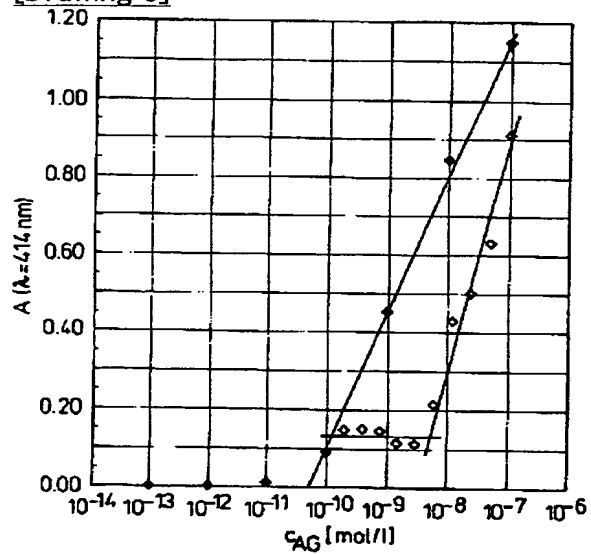
[Drawing 1]



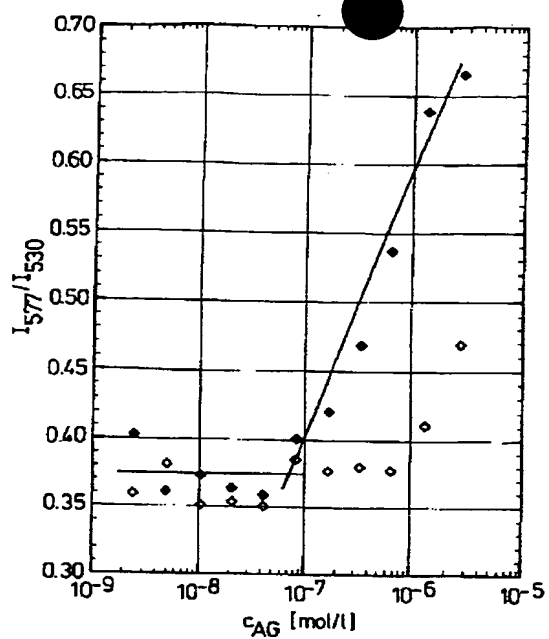
[Drawing 2]



[Drawing 3]



[Drawing 4]



[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-54094

(43) 公開日 平成9年(1997) 2月25日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	5 9 5		G 0 1 N 33/543	5 9 5
	5 7 5			5 7 5
33/53			33/53	U

審査請求 未請求 請求項の数1 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平8-229454

(22) 出願日 平成8年(1996) 8月13日

(31) 優先権主張番号 1 9 5 3 0 0 7 8 . 5

(32) 優先日 1995年8月16日

(33) 優先権主張国 ドイツ (D E)

(71) 出願人 390023607

バイエル・アクチエンゲゼルシャフト

BAYER AKTIENGESELLS
CHAFT

ドイツ連邦共和国デー51368 レーフェル
クーゼン (番地なし)

(72) 発明者 アンケ・ディーデリヒ

ドイツ67227フラウエンタール・ハイドン
シユトラーセ4アー

(72) 発明者 マテイアス・レシエ

ドイツ04229ライブツイヒ・ホルバインシ
ユトラーセ41

(74) 代理人 弁理士 小田島 平吉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ストレプトアビジンとビオチンを基材とする光学的固相バイオセンサー

(57) 【要約】

【課題】 生物分子 (受容体) によって溶解された分子 (被検体) を特異的に認識し検出するための光学的バイオセンサーの提供。

【解決手段】 a) 透明支持体、b) 最上層としてビオチン化ポリリジン臭化水素を含有する、ポリアニオンとポリカチオンの隣接した多重層、c) イオン性の最上層の、ビオチン化層に結合しているストレプトアビジンによるカバー、d) 受容体としてのさらなるビオチン化生物分子、を含んでなり、蛍光染料F 1がストレプトアビジンに結合するか、または他の生物分子に結合することが可能である、蛍光染料F 1とF 2の間のフェルスター・エネルギー移動に基づく、例えば試験ストリップの形態の新規な光学的固相バイオセンサーが提供される。被検体は染料F 2が取り付けられるか、またはF 2を取り付けられた被検体と競合してバイオセンサーに結合する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 a) 透明支持体、

b) 交互にポリアニオンとポリカチオンからなり、そして最上層としてビオチン化ポリカチオンを含有し、ビオチン化度がカチオン性基の等価数に基づいて 20～80 モル%、好適には 30～70 モル%、特に好適には 40～60 モル%である隣接した多重層、

c) ビオチン化されたカチオン性の最上層の、このビオチン化層に結合するストレプトアビジンによるカバー、

d) 蛍光染料 F 2 で標識された被検体に結合することができ、蛍光染料 F 1 をポリイオン性基材層に、ストレプトアビジンに、またはさらなる抗体を結合している生物分子もしくはそれらの抗体に結合されることが可能である、受容体としてのさらなるビオチン化生物分子、好適には抗体を含んでなる、2 種の蛍光染料 F 1 と F 2 との間のフェルスター・エネルギー移動を使用して被検体の特異的に認識するための、受容体として生物分子を持つ光学的固相バイオセンサー。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、蛍光染料で標識することができる、そして生物分子（以下、受容体と呼ぶ）がその存在を特異的に認識する溶解された分子（以下、被検体と呼ぶ）を検出するための光学的バイオセンサーに関する。この場合に関係するものは、第二の蛍光染料で標識された検出すべき分子へのエネルギー移動過程によって、その分子の存在と量の測定が可能となる、蛍光染料を持つ固相センサーである。置換またはサンドイッチ反応によれば、未標識被検体の測定も可能となる。

【0002】

【発明の背景】 生物学的起源の液体試料中のホルモン、酵素、他のタンパク質、炭水化物、核酸、薬理学的活性化化合物、毒素などのような被検体を検出するには種々の方法がある。既知の方法の中には、免疫学的検定法およびそれに関連する方法が、有機物質の極少量を測定するための高感度検出法として傑出している。免疫学的検定法は一般的に、受容体分子例えば抗体が、リガンド分子の構造と分子的構成を特異的に認識し、それが非極性および/または極性相互反応によると規定されていても、かかる方法でこの分子に極めて特異的に結合する能力に基づく。

【0003】 免疫学的検定法は種々の方法を使用して行われる。これらの方法には種々の標識技術が含まれ、それらは放射性、酵素結合および蛍光標識の方法によって被検体を定量することを目的としていることが多い

(E. F. Ulman, P. L. Khanna, *Methods in Enzymology*, 74 (1981) 28-60)。放射線のない蛍光エネルギー移動

(フェルスター・エネルギー移動または共鳴エネルギー

移動、RET) は最後に記載した方法の特別の事例と考えられ、これを使用して、2 種の蛍光染料の相対的な幾何学的位置を、相互の距離が多くとも数 nm である場合でも、測定することができる。従って、受容体/リガンド対の即時相互作用を直接的に検出することができる

(L. Stryer, *Annual Reviews in Biochemistry* 47 (1978) 819-846)。この原理については免疫学的検定法とバイオセンサーシステムの技術中で繰り返し記述されている (S. M. Barnard, D. R. Walt, *Science* 251, 927 (1991)、欧州特許第 150905 号明細書、西独特許第 3938598 号明細書)。

【0004】 さらに、本発明は、検出原理としてフェルスター・エネルギー移動を用いる光学的バイオセンサーに特に適する、分子的に薄く整った層構造中への生物分子の固定化に関する。固相上での受容体の固定化はバイオセンサーにとって決定的に重要である。現在の技術によれば、タンパク質は通常、イオン性もしくは疎水性相互作用によって吸着的に表面に結合するか、または補助剤を使用して共有結合によって結合する。上記の後者の方法の模範的な例として、3-アミノプロピルトリエトキシシランによりガラスを活性化し、引き続いてグルタルアルデヒドによりタンパク質を結合させ、得られたシッフ塩基を水素化ホウ酸ナトリウムによって還元する方法が挙げられる。免疫学的検定法で使用される方法の総説が、例えば、P. Tijssen 著「酵素免疫学的検定法の実践と理論 (Practice and Theory of Enzyme Immunoassays)」、第 297-328 頁 (Elsevier, Amsterdam 1987) にある。さらに、生物工学的的方法としては、透過性重合体または膜中に酵素を封入する方法が通例である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 吸着によって行われる方法では、タンパク質固定化の安定性が不足するという欠点があるが、結合剤または活性化剤を用いる共有結合では、比較的多数の工程段階、高純度のある場合には不安定な試薬の使用、または必ずしもすべてのタンパク質が安定ではない反応条件の使用が必要となることが多い。最も通常の固定化技術は、受容体が部位特異的に結合しないので、高いパーセントの受容体において、次の反応に重要である本体が立体的に遮断されているという共通の問題点を持っている。タンパク質の変性のためか、またはタンパク質による表面のコーティングがあまりに薄いために、タンパク質固定化の効率が不足することが多い。さらに、いくつかの活性化剤は架橋することがあるので、得られる表面の鮮鋭さを劣化する。従って、固定化は再現性が極めて乏しい。フェルスター・エネルギー移動による被検体濃度の定量的場合、エネルギー

一供与体と受容体との間の距離が局部的表面の組成によって不規則に変化し、このことは一般的にこのシステム関連の測定の精度の低下を伴うことは不都合であることが判明している。

【0006】上記のシステム関連の問題点を解決する一つの可能性は、支持体を分子的に整ったフィルムでコーティングすることである。このことは、例えば、西独特許第4319037号明細書に記載のように、構造形成単位の外に、固定化すべきタンパク質を共有結合させることができる、側鎖中に反応性基を有するモノマーを含有する薄いフィルム形成性共重合体で、支持体をコーティングすることによって行うことができる。この方法の欠点は、一般的に、重合体中の反応性単量体の比率が制限されることによって、反応性基の数が制限されることである。結果として、表面上の受容体のコーティングの厚みがあまりにも薄くなることが多い。

【0007】バイオセンサーの概念におけるさらなる欠点は、タンパク質と固相表面との間にしばしば起こる非特異的な相互作用である。このことによって、望ましくない疎水性またはイオン性相互作用による吸着が起こり、再現性のない結果が生じ、また測定精度の減少となる。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、a) 透明支持体、

b) 交互にポリアニオンとポリカチオンからなり、そして最上層としてビオチン化ポリカチオンを含有し、ビオチン化度がカチオン性基の等価数に基づいて20～80モル%、好適には30～70モル%、特に好適には40～60モル%である隣接した多重層、

c) ビオチン化されたカチオン性の最上層の、このビオチン化層に結合しているストレプトアビジンによるカバー、

d) 蛍光染料F2で標識された被検体に結合することができ、蛍光染料F1がポリイオン性基材層に、ストレプトアビジンに、またはさらなる抗体を結合している生物分子もしくは抗体に結合されることが可能である、受容体としてのさらなるビオチン化生物分子、好適には抗体を含んでなる、2種の蛍光染料F1とF2との間のフェルスター・エネルギー移動を使用して被検体を特異的に認識するための、受容体として生物分子を持つ光学的固相バイオセンサーに関する。

【0009】好適な態様では、c)に記載の層に、ビオチン化受容体が結合し、それは特異的な認識反応によって該受容体部分に抗体を固定化することができる。

【0010】従って、本発明は、生物分子、特に受容体または抗体、の固相上への固定化に関し、その固定化は永続的で直接的な性質のものであり、受容体をもつ表面の大きいコーティング厚みが達成されている。被検体の結合はフェルスター・エネルギー移動によって検出され、

そしてエネルギー供与体と受容体との分子的に整った相互配列のために、再現性があり、その濃度依存性において規則性がある。表面はタンパク質の非特異的吸着に対して同時に不活性化される。本発明では、有機的かつ生物学的成分を、天然のビオチン/ストレプトアビジン系を使用して、分子的に整った層に固定化することによって、これらの要件が追及され、そして上記の課題が解決される。ストレプトアビジンはビオチン（ビタミンH）に対して4つの結合部位を有するタンパク質である。それ故、それはビオチン化生物分子の結合のためのマトリックスとして使用することができる。ストレプトアビジンに対するビオチン結合定数は $\sim 10^{15} \text{ M}^{-1}$ であるから、ストレプトアビジンに対するビオチン結合は殆ど非可逆的である。

【0011】本発明は特に、多重層の構築のためにポリカチオンとポリアニオンを使用することを特徴とする。

【0012】本発明は、一般的に、フロートガラスまたは石英ガラスまたは例えばポリエステル、ポリカーボネートもしくはポリエチレンテレフタレートのような有機重合体または他の透明で非蛍光固体を、アニオン性とカチオン性重合体の連続的物理吸着による自己集成（SA）技術により、多重層でコーティングすることによって実現する。この方法は欧州特許第472990号明細書に詳細に記載されている。本発明では、物理的吸着される多重層の最後の層は、アミノ基上でビオチン化されたポリカチオンである。ポリカチオンは、欧州特許第0472990号明細書に記載の方法に従って、ビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドエステルまたは他の反応性エステルを用いて、カチオン性基の等価数に対して20～80モル%、好適には30～70モル%、特に好適には40～60モル%までビオチン化される。本発明に適するポリカチオンは、例えば、ポリリジン、ポリアルリルアミン、ポリビニルアミン、ポリ（4-ビニルピリジン）、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリアルギニン、ポリアスパラギン、ポリグルタミン、ポリエチレンイミンおよびそれらの基本的な単量体の共重合体であり、好適にはポリリジンとポリアルリルアミンである。例えば窒素原子が2または3個の水素原子を有するアンモニウム基として存在するこれらのポリカチオンは、例えば、対イオンとして、塩化物または臭化物のようなハロゲン化物、硫酸塩、重硫酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、炭酸塩、重炭酸塩、リン酸塩、水素リン酸塩、およびギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸塩またはトリクロロ酢酸塩のような脂肪族カルボン酸アニオンを有することができる。本発明に従うビオチン化可能ポリカチオンは、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリグルタミン、ポリアスパラギン、ポリアクリルアミド、ポリメタクリルアミド、ポリアルリルアミンおよびそれらの基本的な単量体の共重合体であり、好適にはポリリジンとポリアルリルアミンである。ポリアルリルアミンは、例えば、

ポリスチレンスルホネート (PSS)、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリ(2-アクリル-アミノ-2-メチル-1-プロパンスルホン酸)、ポリビニルスルホン酸、ポリビニルスルフェート、デキストランスルフェート、セルローススルフェートおよびそれらの基本的な単量体の共重合体であり、好適にはポリスチレンスルホネートである。ポリアニオン中の対カチオンは、例えば、 H^+ 、 Na^+ 、 K^+ および NH_4^+ であり、好適には Na^+ または K^+ である。ビオチン化カチオンの等価量は所望の要求量の化学量論によって調節することができる。ストレプトアビジンとのインキュベーションの結果として、ストレプトアビジンはビオチン化重合体層に結合する。次に、蛍光実験が示すように、表面はストレプトアビジンで殆ど完全に、中断なくコーティングされる。かかるシステムはバイオセンサーについて上記で要求された要件および利点を示す。一方では、バイオセンサー表面は、出来る限り厚いタンパク質ストレプトアビジンによるコーティングによって、非特異的相互作用が遮断され、他方では、バイオセンサーとして使用される固体界面の機能化のために、万能結合マトリックスを利用可能にする。当業者に十分周知である、蛍光染料F1 (例えば、蛍光イソチオシアネート) によるタンパク質ストレプトアビジンの標識化のために、供与体染料はフェルスター・エネルギー移動のために利用できるようになる。

【0013】ビオチン化重合体表面上にストレプトアビジンを固定化した後、まだコーティングされていない結合部位を持つストレプトアビジンは、受容体としてさらなるビオチン化生物分子が結合するための、特に抗体が結合するためのマトリックスとして役立つ。抗体の結合のための複数の好適な変法が可能である。従って、本発明の一つの態様は、ビオチン化プロテインAまたはビオチン化プロテインGをストレプトアビジンマトリックスに結合させる方法である。プロテインAをN-ヒドロキシスクシンイミドによってまたは他の反応性エステルを経てビオチン化することは当業者には容易に可能でありかつよく知られている。プロテインAは細菌スタヒロコッカス・アウレウスの細胞壁から得られるタンパク質である。IgG型の免疫グロブリンをそれらのFc部分上に特異的に結合することができる。この方法はさらに抗体を部位特異的に固定化する利点を有する。抗体のFab部分は遊離である。抗原結合部位の遮断のために、免疫学的活性の減少が起こる。F1のストレプトアビジンへの結合の外に、F1はまた上記の他の生物分子に結合することができる。しかし、ストレプトアビジンへの結合が好適である。

【0014】この種類の光学的固相バイオセンサーは例えば試験ストリップの形態で使用することができる。

【0015】イムノセンサーの他の態様はストレプトアビジンマトリックスへのビオチン化抗体の結合を含んで

なる。この文脈では、本発明による二つの態様が考えられる。一方では、抗体はビオチン-N-ヒドロキシスクシンイミドによってまたは他の反応性エステルを経てビオチン化されることができる。抗体のビオチン化のかかる形態は、当業者に良く知られていて、ビオチン化が部位特異的には起こらないという欠点を有する。IgG分子の一部も抗原結合部位またはその近辺でビオチン化され、その結果後者の立体遮断が起こり、そして抗体の免疫学的活性およびセンサーの感度が減少する。本発明による他の態様では、酸化された抗体と反応するヒドラジド反応性基を有するビオチン誘導体を使用される。抗体の酸化中、IgGのFc部分上に位置する炭水化物は、当業者に既知である反応(グリコール開裂)で開裂して、アルデヒドを生成する。これらはビオチン誘導体のヒドラジド基と反応してヒドラゾンを生成する。ビオチン基は抗体のFc部分に部位特異的に結合する。ビオチン化抗体はストレプトアビジンマトリックスに結合して、イムノセンサーの試験ストリップの表面を完成し、ビオチン化プロテインAを経る結合は必要としない。

【0016】次に、試験ストリップは、適切な受容体染料F2 (例えば、ローダミンイソチオシアネート) を備えた被検体を、受容体、特に抗体と被検体との相互作用の結果として、認識および定量することができる。被検体は、コーティングされた支持体を、被検体としての分子が存在することが疑われる溶液(試料溶液)と単純に接触させ、続いて蛍光測定を行うことによって検出される。供与体染料(F1)および受容体染料(F2)の蛍光が測定される。受容体染料F2で標識された被検体が試験液体(試料溶液)中にある場合、固定化抗体に特異的に結合した後、フェルスター・エネルギー移動の結果として、非結合状態と比較して受容体蛍光の強度は増加し、供与体の強度は減少する。別法として、非標識被検体が置換反応によって測定されなければならない場合、試験ストリップは最初に関係被検体の受容体標識類似体と平衡させる。この状態では、F2の受容体蛍光はF1の供与体蛍光に勝る。試験液体からの未標識被検体が、平衡させられた試験ストリップと接触する場合、置換反応の後、フェルスター・エネルギー移動が中断され、その結果F1の供与体蛍光の増加およびF2の受容体蛍光の減少によって未標識被検体の結合が示される。両方の場合、受容体蛍光および供与体蛍光の変化は明らかに被検体の濃度と関連している。フェルスター・エネルギー移動は慣用の蛍光分光計で測定することができるが、エネルギー移動のイムノセンサーのために特別に設計された装置で測定することもできる。次いで、適切な検量曲線によって、分析液体中の被検体の濃度を決定することができる。さらなる態様では、検出すべき被検体の存在下で、これとセンサーの最上層への結合について競合する、蛍光染料F2で標識された特異的に結合する分子が、検出すべき被検体の存在が考えられる分析液体中に

既知量で添加される。次いで、検出すべき被検体の濃度は、F 1 もしくは F 2 の蛍光強度または 2 つの強度の比率の依存性によって測定される。

【0017】イムノセンサーの本発明による他の態様は、供与体染料 F 1 が受容体、好適には抗体に、好適には上記の形態の酸化された抗体のヒドラジド反応性基によって結合することを含んでなる。この態様では、フェルスター・エネルギー移動の効率は、供与体染料 (F 1) と受容体染料 (F 2) との間の平均距離の減少だけ増加し、このことは試験方法の感度を増加させるのに使用することができる。

【0018】次の図面によって本発明を詳細に説明する。

【0019】図 1 はフェルスター・エネルギー移動のイムノセンサーのための試験ストリップの多重層の構造 (上図) および検出原理 (下図) を図式的にそして大体の尺度で示す。

【0020】図 1 : イムノセンサーの図式構造と機能。分子的成分は大体の尺度で描かれている。支持体 I は記載よりもっと厚い。

【0021】上図では：透明支持体 I (例えば、ガラス)、高分子電解質の多重層 I I (図を単純化するために、最後のビオチン化層のみが示される)、F 1 で蛍光標識されたストレプトアビジン層 I I I、ビオチン化タンパク質 A 層 I V およびその上に固定化された抗体 V。

【0022】下図では：試験液で湿らせた後、観測される蛍光の波長は、ストレプトアビジンに結合した蛍光染料 F 1 が励起した後、直接発光が存在するかどうか (点線の矢印)、または標識被検体にエネルギー移動 (R E T = 破線の矢印) した後の励起エネルギーが赤方偏移して発光されるかどうか (実線の矢印) に依存する。直接発光の強度に対する赤方偏移の比率は、明らかに面積当たりの結合被検体分子の数に依存する。

【0023】図 2 は、製造の各段階における層構造物の X 線反射曲線を示す。

【0024】図 2 : 製造の各段階における層構造物 (支持体物質：ケイ素) の X 線反射曲線を示す。データの各セットは各場合、相互に比較して 100 のファクター偏移させた。下から上の順に、曲線は、最初に高分子電解質の多重層、次いでストレプトアビジンでコーティングされた層、引続いてさらにビオチン化タンパク質 A でコーティングされた層、および最後に I g G 抗体を備えた層を示す。パルス移動 Q_z は A^{-1} で横軸にプロットされ、X 線強度 I は縦軸にプロットされている。

【0025】本実施例の場合の測定結果から、表面は、各製造段階で規則正しく成長した有機物質の界面層でコーティングされていて、そして各工程で試料は分子的に平滑であることが分かる。このことは特に、表面の機能化の結果が、横向きに不均質な構造を持つ固相界面のコーティングにはならない、即ち、液滴形成はナノメータ

の等分目盛においても起こらないことを意味している。

【0026】図 3 は、図 1 に記載の方法と同様に製造された、そして X 線反射性の測定によって図 2 中に記録されたセンサー表面上での E L I S A 測定結果を示す。

【0027】図 3 : 各種センサー表面の抗原による力価測定。特異的結合が E L I S A によって検出された。I g G が P S S 層上に静電的に吸着した試料 (白ダイヤ印) を、本明細書に記載した技術によって製造されたセンサー (黒ダイヤ印) と比較した。抗原濃度 c_{AG} (モル / l) は横軸に、光学濃度 A ($\lambda = 414 \text{ nm}$) は縦軸にとってある。

【0028】図 4 は、図 3 に記載の試料と同様に製造された試料上でのバイオセンサー測定の結果を示す。

【0029】図 4 : センサー表面の抗原による力価測定 (黒ダイヤ印)。特異的な結合がエネルギー移動によって検出された。抗原が約 2 倍希釈の培養上澄液中に存在した。対照 (白ダイヤ印) : ストレプトアビジン層 (タンパク質 A と受容体層なし) まだけ作成された試験ストリップ上での抗原の吸着。横軸は培養上澄液中の濃度 c_{AG} (モル / l) を示す。縦軸は蛍光染料 F 1 および F 2 の 577 および 530 nm での蛍光強度の比率を示す。

【0030】

【実施例】

1. 使用した化学品

重合体 : ポリスチレンスルホネート、ナトリウム塩 (P S S)、MW = 70, 000、Aldrich 社。

【0031】ポリアリルアミン塩酸塩 (P A H)、MW = 50, 000 - 60, 000、Aldrich 社。

【0032】ポリエチレンイミン (P E I)、MW = 50, 000、50% 濃度水溶液、Aldrich 社。

【0033】ポリ-L-リジン臭酸塩 (P L)、MW < 50, 000、Bachem-Biochemica 社。

【0034】P S S は水溶液として Roth 社の V I S K I N G 27 / 32 透析チューブ中で 2 日間極めて純粋な水に対して透析し、次いで凍結乾燥した。

【0035】**タンパク質** : ストレプトアビジン、Boehringer-Mannheim 社。

【0036】プロテイン A、Pharmacia 社。

【0037】ウサギ I g G、ポリクロナール、特異性：抗マウス I g G、Immunol. Institute Univ. Mainz。

【0038】ウシ血清アルブミン (B S A)、Sigma 社。

【0039】**抗体** : マウス I g G、モノクローナル、培養上澄液、Immunol. Institute Univ. Mainz。

【0040】ワサビダイコン・ペルオキシダーゼ (H P O) 結合マウス I g G、アフィニティー精製、Jack

son Immuno-Research Laboratories, Dianova, U. S. A.

【0041】蛍光体：ローダミンBイソチオシアネート (RITC)、Sigma社。

【0042】フルオレシニンイソチオシアネート異性体I (FITC)、Sigma社。

【0043】ストレプトアビジンの標識化はタンパク質分子当たり平均1.4 FITCで行い、マウスIgGの標識化はタンパク質分子当たり平均3 RITCで行った。

【0044】ビオチン活性エステル：ビオチンアミドカプロイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、Sigma社。

【0045】プロテインAをビオチン化するためには、活性エステルとタンパク質を12対1の分子比で秤量した。

【0046】洗浄剤：ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート (TWEEN20)、Sigma社。

【0047】PBS緩衝剤：リン酸水素ナトリウム、一水和物、p. a.、Merck社。

【0048】リン酸水素二ナトリウム、p. a.、Merck社。

【0049】塩化ナトリウム、p. a.、Merck社。

【0050】クエン酸緩衝剤：リン酸水素二ナトリウム、p. a.、Merck社。

【0051】クエン酸一水和物、Sigma社。

【0052】塩化カリウム、p. a.、Merck社。

【0053】塩化マグネシウム、六水和物、p. a.、Merck社。

【0054】ABTS：2, 2'-アジノービス (3-エチルーベンゾチアゾリン) -スルホン酸、Sigma社。

【0055】ガラス基板：(38×12) mm²および(1~1.2) mm厚みの顕微鏡スライド、Gebr. Rottberg GmbH社。

【0056】2. 支持体の洗浄

支持体は標準操作法 (W. Kern, D. A. Puotinen, RCA Review, 31 (1970), 187) にしたがって洗浄した。

【0057】3. 支持体の製造

すべての溶液は蒸留水を使用して製造した。水で湿潤させた支持体を、PEI溶液 (2.2 mg/mlに希釈さ

れた) 中に30分間入れ、次いで10mlの水で3回毎回約30秒間洗浄し、次いで窒素のゆっくりした流れ中で風乾した。次いで、試料をPSS溶液 (10mlの2M NaCl溶液中の20mgのPSS) 中に約20分間入れ、洗浄し、上記の通り乾燥した。支持体をPAH溶液 (10mlの2M NaCl溶液中の20mgのPAH) 中にさらに20分間入れ、再び洗浄し、乾燥した。上記と同様に、さらなるPSS層、PAH層およびPSSを順番に支持体上に吸着させた。ビオチンで機能化するために、支持体を、ビオチン化されたポリリジン臭酸塩 (PLB) (0.4M NaCl中の5mg/10ml) の溶液中に20分間入れ、次いで洗浄し、再び乾燥した。コーティング支持体は使用するまで4℃の温度で貯蔵した。

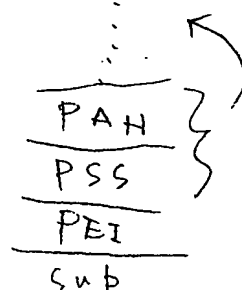
【0058】4. タンパク質異種多重層の作成：PLBコーティング支持体をFITC-ストレプトアビジン溶液中 (10mMPBS緩衝液、pH=7.2中の10⁻⁷モル/lのFITC-ストレプトアビジン、150mM NaCl) に約30分間入れ、10mlの水で3回洗浄し、次いでビオチン化プロテインAの溶液 (5×10⁻⁷モル/l、上記のPBS緩衝液) 中にさらに40分間入れ、純粋のPBS緩衝液で3回洗浄した。個々のタンパク質コーティングの間の乾燥工程は省略した。プロテインAでコーティングされた支持体をウサギIgG溶液 (特異性：抗マウスIgG、5×10⁻⁷モル/l、上記のPBS緩衝液) 中に40分間入れ、純粋な緩衝液で3回洗浄した。抗原の結合まで、支持体をPBS緩衝液中で貯蔵した。

【0059】図2は、試験ストリップ (支持体物質シリコン) の製造中の各吸着工程の間に (乾燥試料について) 測定されたX線反射曲線を示す。これらの結果から、吸着過程の間、線状分子の目盛で均一であるコヒーレント層構造が形成されること、各場合の層厚みの増加は吸収剤の分子の寸法に一致すること、および各吸着工程後の表面が分子的に平滑であることが確認される。例外は末端抗体層であり、それは、抗体の長い分子形状およびプロテインAによる部位選択的結合のために、大量の緩衝水溶液を含有する。この層は測定中の乾燥工程で崩壊し、その後分子的寸法から期待されるより顕著に薄くなるようである。図2からの実験データは表1で定量的に評価される。

【0060】

表1 イムノセンサーの活性界面層の分子的寸法

コーティング工程	層厚みの増加 (Å)	表面の荒さ 有機界面/空気 (Å)
6分子の高分子電解質層 (PLBを含む)	203	6
高分子電解質フィルム/PLB 上のストレプトアビジン層	56	11



ストレプトアビジン層上の
 ビオチン化プロテイン
 プロテインA上の
 ウサギIgG (抗マウス)

5. 抗原とのインキュベーション、対照を含む

a. ELISA測定

試料は上記の通りにシリコン上に製造した。10mg/mlのBSAを、0.1%TWEEN20を含有するPBS緩衝液中に溶解させた。このタンパク質溶液を、HPO標識抗体(マウスIgG-HPO)の希釈系列(濃度が 10^{-13} ~ 10^{-17} モル/lである)の製造のためのELISA測定に使用した。抗原とインキュベートした後、試料を、3g/lのABTおよび0.0075%のH₂Oを有するクエン酸緩衝液中に展開し、測定した。図3には、本明細書に記載の技術により製造された試料についての代表的な結果が示される。薄い分子層のPSSでコーティングされたシリコン界面上にIgGのみが静電的に吸着させられた試料の滴定が、これと比較される。新規の技術によって製造された試料の特徴となる高い感度、良好な直線性および低い非特異的吸着が図中で明らかにみることができる。

【0061】b. 蛍光測定

試料はフロートガラス上に上記の通り製造した。10mg/mlのBSAをPBS中に溶解させた。このタンパク質溶液をRITC標識抗原の希釈系列を製造するのに使用した。この希釈系列では、抗原の濃度は 2.5×10^{-9} ~ 5×10^{-6} モル/lであった。支持体のある一定の濃度の溶液中に約40分間入れ、次いで0.1%TWEEN20で処理されたPBS緩衝液(上記の緩衝剤組成)中で約1分間5回洗浄した。支持体を窒素の流れ中で風乾し、測定まで4℃で暗所で貯蔵した。

【0062】抗原と基板との非特異的な相互反応を定量するために、支持体を同一の順序でストレプトアビジン層までコーティングし(しかし、タンパク質AとIgG層なしで)、各場合に希釈系列の抗原含有溶液中に約40分間入れ、上記の通り洗浄し、乾燥した。

【0063】試料および基準支持体を慣用の蛍光分光計および乾燥状態で蛍光エネルギー移動を測定するために特別に設計された装置で測定した。図4は代表的な結果を示す。

【0064】なお、本発明の主たる特徴および態様を以下に記載する。

【0065】1. a) 透明支持体、

b) 交互にポリアニオンとポリカチオンからなり、そして最上層としてビオチン化ポリカチオンを含有し、ビオチン化度がカチオン性基の等価数に基づいて20~80モル%、好適には30~70モル%、特に好適には40~60モル%である隣接した多重層、

c) ビオチン化されたカチオン性の最上層の、このビオチン化層に結合しているストレプトアビジンによるカバ

7 11
 13 17

一、

d) 蛍光染料F2で標識された被検体に結合することができ、蛍光染料F1をポリイオン性基材層に、ストレプトアビジンに、またはさらなる抗体を結合している生物分子もしくは抗体に結合されることが可能である、受容体としてのさらなるビオチン化生物分子、好適には抗体、を含んでなる、2種の蛍光染料F1とF2との間のフェルスター・エネルギー移動を使用して被検体の特異的に認識するための、受容体として生物分子を持つ光学的固相バイオセンサー。

【0066】2. 供与体染料F1がストレプトアビジンに結合している上記1に記載の光学的バイオセンサー。

【0067】3. 受容体、好適には抗体が、それ自体は抗体ではないビオチン化生物分子によって、特にプロテインAまたはプロテインGを経て、ストレプトアビジン層に結合している上記1に記載の光学的バイオセンサー。

【0068】4. ビオチン化されている受容体、好適には抗体が、ストレプトアビジン層に結合している上記1に記載の光学的バイオセンサー。

【0069】5. 被検体分子が、被検体ではない、最上層に結合されかつ蛍光染料F2で標識された他の分子を最上層から取って代わり、そして最終的に結合した被検体分子の濃度が、F2の蛍光強度の減少もしくはF1の蛍光強度の増加または2つの強度の比率の変化の関数として測定される上記1に記載の光学的バイオセンサー。

【0070】6. 被検体分子が、被検体ではない、バイオセンサーの最上層に結合させるために既知量で分析溶液中に添加される、蛍光染料F2で標識された特異的に結合する分子と競合して、そして被検体の濃度がF2もしくはF1の蛍光強度または2つの強度の比率の関数として測定される上記1に記載の光学的バイオセンサー。

【0071】7. 使用された支持物質が、フロートガラス、石英ガラス、ポリエステル、ポリエチレンテレフタレートもしくはポリカーボネートまたは他の透明な非蛍光固体である上記1に記載の光学的バイオセンサー。

【図面の簡単な説明】

【図1】イムノセンサーの構造と機能を図式的に示す図である。

【図2】製造の各段階における層構造体のX線反射曲線を示す図である。

【図3】本明細書に記載の方法で製造された試料(黒ダイヤ印)およびPSS層上にIgGを静電的に吸着させた試料(白ダイヤ印)について、センサー表面上での抗原の吸着をELISA測定で示した図である。

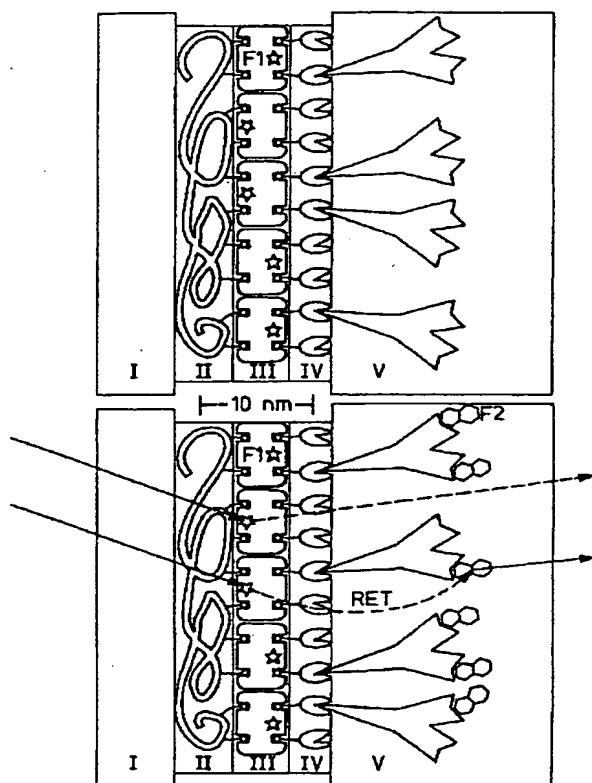
【図4】本明細書に記載の方法で製造された試料(黒ダ

イヤ印) および支持体を同一の順序でストレプトアビジン層までコーティングした試料(白ダイヤ印)について、センサー表面上での抗原の吸着を蛍光測定で示した図である。

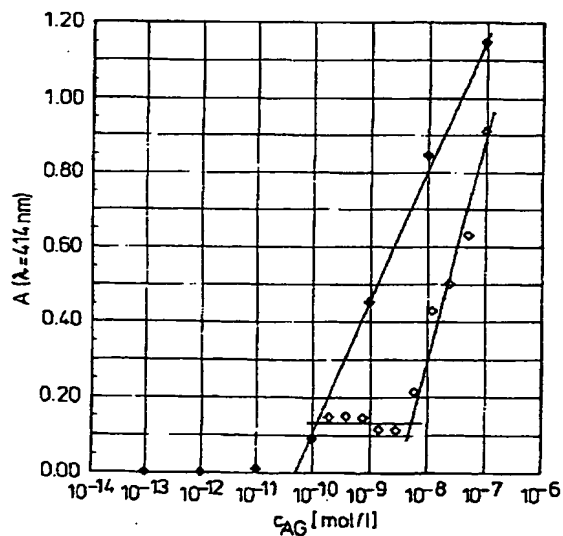
【符号の説明】

- 1 透明支持体
- 2 高分子電解質多重層(ビオチン化層のみ記載)
- 3 F1で蛍光標識されたストレプトアビジン層
- 4 ビオチン化タンパク質A層
- 5 固定化された抗体

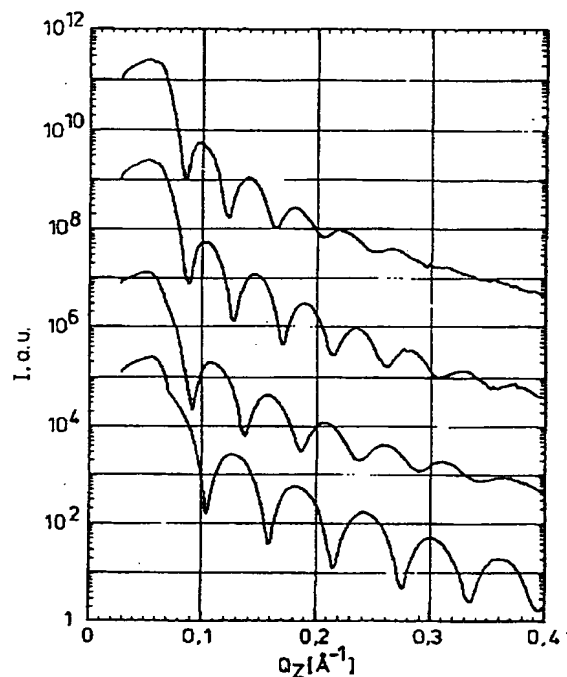
【図1】



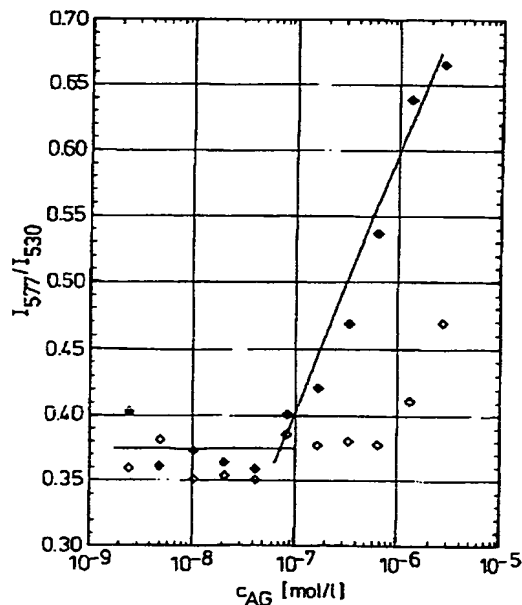
【図3】



【図2】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 ミヒヤエル・フェルカー
ドイツ51061ケルン・モルゲングラーベン
2

(72)発明者 ハンスーウルリヒ・ジークムント
ドイツ51149ケルン・カスパーシュトラ
ーセ55
(72)発明者 ルトガー・ハイリガー
ドイツ51373レーフェルクーゼン・カール
ールンプフーシュトラーセ 8

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.